

УДК 546.48 + 577.12 + 591.84

DOI: 10.15587/2519-8025.2018.147090

МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ В КІСТКОВІЙ ТКАНИНІ ТВАРИН ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КАДМІОЗУ

© Н. С. Хопта, А. М. Ерстенюк

Мета: дослідити особливості метаболічних процесів, біоелементного складу і мінеральної щільності кісткової тканини білих щурів (статевозрілих самців) в умовах ураження іонами кадмію.

Матеріали та методи. Токсикант (CdCl_2 , 1,2 мг/кг) вводили тваринам протягом 10-ти діб, а потім виводили з експерименту на 1-, 14- та 28-ту добу. Досліджували кров і стегнові кістки. У крові вивчали показники кальцій-фосфорного обміну, активність кислої (КФ) і лужної (ЛФ) фосфатаз, концентрацію магнію, гідроксипроліну (ГП) за стандартизованими методиками з використанням наборів реактивів, а також рівень паратгормону і кальцитоніну в динаміці розвитку інтоксикації. У золі стегнових кісток визначали вміст остеотропних біоелементів і токсичного кадмію. Досліджували мінеральну щільність кісткової тканини (МЩКТ) за допомогою еталонної рентгенівської денситометрії.

Результати. У тварин в крові спостерігали зростання концентрації загального та іонізованого кальцію на тлі збільшеної секреції паратгормону і зниженої кальцитоніну; зниження активності ЛФ, збільшення КФ, особливо на 14-й день. Встановлено збільшення концентрації маркерної амінокислоти обміну колагену – гідроксипроліну (в 2,5–3,5 рази) та зниження магнію. При визначенні вмісту остеотропних біоелементів в золі стегнових кісток щурів в умовах впливу CdCl_2 встановлено зниження вмісту кальцію, магнію, міді та цинку в стегнових кістках (на 13–45 %) на тлі значного збільшення вмісту кадмію (в 9,8 рази). Також спостерігається зниження МЩКТ, особливо низькі значення зафіксовані на 14-ту добу.

Висновки. Результати комплексних досліджень свідчать, що в умовах введення в організм тварин кадмій хлориду порушуються метаболічні процеси в кістковій тканині, розвивається дисмікроелементоз, відбувається демінералізація мінеральної фази кістки, руйнується її колагенова матриця, процеси резорбції домінують над остеосинтезом.

Ключові слова: кадмій, кісткова тканина, токсичний вплив, маркери кісткового метаболізму, остеотропні біоеlementи, мінеральна щільність кісткової тканини

1. Вступ

Зростаюче техногенне й антропогенне забруднення довкілля важкими металами [1] підвищує вірогідність їхнього впливу на живі організми в токсичних концентраціях. За даними ВООЗ кадмій (Cd) разом з ртуттю та свинцем віднесено до найнебезпечніших важких металів. Індустріальне забруднення Cd характерне для промислових регіонів України [1], районів з інтенсивним використанням мінеральних добрив (особливо фосфатних) та пестицидів у сільському господарстві та спалюванням побутових відходів.

В організм людини Cd може надходити з харчовими продуктами (20-50 мкг, що становить 90–95 % його надходження), питною водою (0,1 мкг), а також інгаляційним шляхом. Зазвичай, овочі, фрукти, м'ясо, риба містять 10–20 мкг/кг Cd, однак високий вміст Cd виявлено в грибах, морепродуктах (понад 100 мкг/кг, тобто тисяч мкг) [2]. Встановлено, що суттєвим додатковим джерелом надходження Cd в організм є тютюновий дим: особи, які палять цигарки, додатково отримують 5–60 мкг кадмію щодоби. Згідно з вимогами ВООЗ, рівень надходження Cd в організм людини з усіх джерел не повинен перевищувати 400–500 мкг/тиждень. Отже, враховуючи вищезазначене, актуальним є проведення експериментальних досліджень впливу сполук кадмію на живі організми, зокрема, на кісткову тканину (КТ) тварин.

2. Літературний огляд

Механізм токсичного впливу Кадмію пов'язаний із його здатністю активувати процеси перокси-

дації ліпідів та білків при одночасному зниженні активності системи антиоксидантного захисту, порушувати цілісність мембран, пригнічувати активність ферментів, блокуючи –SH групи [3, 4]. Біоцидні ефекти йонів Cd^{2+} виявляються в його здатності до утворення хелатних комплексів із біомолекулами, що призводить до значної кумуляції в тканинах і органах [3, 4]. Деякі автори [5, 6] вказують на прямий токсичний вплив Cd^{2+} на мінеральний матрикс кісток, зумовлений їх антагонізмом із есенціальними макро- та мікроелементами. Інші ж вважають, що токсична дія Cd стосовно КТ зв'язана з ураженням нирок [7] та щитоподібної залози [8]. Є експериментальні дані [9], що за умов надходження Cd^{2+} змінюється ультраструктура кісткових клітин.

3. Мета та задачі дослідження

Мета дослідження – дослідити особливості метаболічних процесів, біоелементного складу і мінеральної щільності кісткової тканини білих щурів (статевозрілих самців) в умовах ураження іонами кадмію.

Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

1. Дослідити показники маркерів кісткового метаболізму та концентрації кальційрегулюючих гормонів в плазмі крові у динаміці експериментальної кадмієвої інтоксикації,

2. Визначити вміст остеотропних біоелементів у золі стегнових кісток щурів-самців та мінеральну щільність кісткової тканини,

3. Знайти статистично значимі кореляційні зв'язки між досліджуваними показниками.

4. Матеріали та методи

Дослідження проведено на 53 особинах білих статевозрілих щурів-самців масою 180–220 г. Утримання тварин, їх годівля та маніпуляції з ними проводили з дотриманням вимог біоетики [10]. Тварин поділено на інтактних та дослідну групу. Інтоксикацію здійснювали протягом 10 діб введенням CdCl_2 , 1,2 мг/кг щоденно раз на добу. Після завершення введення токсикантів тварин виводили з експерименту на 1-, 14- та 28-му добу під легким ефірним наркозом. Брили кров і стегові кістки, які очищували від м'яких тканин, піддавали денситометричному дослідженню та озоленню. Біохімічні дослідження показників маркерів кісткового метаболізму проводили у біохімічній лабораторії на базі Центру біоеlementології Івано-Франківського національного медичного університету за стандартизованими методиками з використанням наборів реактивів: “Філісіт” та “Lachema” (Чехія). Концентрацію ГП визначали окисненням його H_2O_2 до піролу в лужному розчині за наявності Cu^{2+} (Склярів О. Я., 2002). Концентрацію йонізованого Ca^{2+} визначали комплексометрично (Фастовець О. О., 2005). Визначення концентрації кальцитоніну і паратгормону (ПТГ) проводили з допомогою імуноферментного аналізу. Макро- і мікроелементний склад стегових кісток визначали атомно-абсорбційним методом з використанням спектрофотометра С-115ПК [10]. Структурно-функціональний стан КТ досліджували за допомогою еталонної рентгенівської денситометрії стегових кісток щурів на апараті KUNT CERD-701.

Рентгенограму алюмінієвих еталонів і стегових кісток тварин проводили за таких параметрів: 44 мВ, 25 мА та 0,020 с – час експозиції. Статистичну обробку проводили на ПК за допомогою програм Microsoft Excel та STATISTICA 6,0, результати вважалися достовірними, якщо $p < 0,05$. Для оцінки ступеня взаємозв'язку досліджуваних показників розраховували кореляційні матриці за методом Пірсона.

5. Результати дослідження та їх обговорення

Проведені дослідження показують різнонаправлений характер змін концентрації основного макроелемента мінерального матриксу кістки – Кальцію (табл. 1). Зокрема, у тварин на 1-шу добу по завершенні введення CdCl_2 концентрація загального кальцію (Ca) плазми достовірно знижувалася на 17 %, у наступні періоди (14-та та 28-ма доби) – поступово підвищувалася, перевищуючи значення інтактних на 25–38 % відповідно ($p < 0,005$ – $0,001$). Як відомо, Кальцій в плазмі крові знаходиться у вигляді трьох молекулярних форм: в йонізованому стані Ca^{2+} (найбільш активний); у зв'язаному з білками (переважно з альбумінами) та у вигляді малодисоційованих солей з цитратами і фосфатами. У плазмі крові тварин дослідних груп у ранньому періоді інтоксикації спостерігалось зниження концентрації Ca^{2+} на 15–23 % з достовірним зростанням на 28-му добу на 22 %, порівняно з інтактною групою тварин.

Одночасно, на 1-шу добу концентрація зв'язаного Кальцію плазми крові достовірно не відрізнялася від показників інтактних, а на 14-ту та 28-му доби збільшувалась відповідно на 41 % та 43 % ($p < 0,001$).

Таблиця 1

Концентрація різних форм Кальцію, Магнію та неорганічного фосфату у плазмі крові щурів-самців, ($M \pm m$)

Досліджувані показники (концентрація, ммоль/л)	Групи тварин			
	контрольна (інтактні) n=18	Уражені CdCl_2		
		1-ша доба (n=13)	14-та доба (n=11)	28-ма доба (n=11)
загального Ca	2,34±0,08	1,94±0,13 ***	2,91±0,21 *	3,23±0,18 **
йонізованого Ca^{2+}	0,68±0,02	0,52±0,03 ***	0,58±0,04 *	0,83±0,05 *
$\text{Ca}_{\text{зв'язаного}}$	1,66±0,08	1,43±0,14 *	2,33±0,14 **	2,37±0,19 **
неорганічного фосфату	1,33±0,05	1,39±0,06	1,76±0,12 ***	1,69±0,13 *
гідроксипроліну	28,31±2,79	52,38±2,19 *	60,54±4,78 **	70,53±3,14 **
Магнію	0,72±0,08	1,66±0,19 **	0,42±0,07 ***	0,47±0,05 **

Примітка: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ – ступінь вірогідних змін порівняно з показниками інтактної групи тварин

Рівень Ca в організмі перебуває під контролем гормонів щитоподібної та парашитоподібних залоз. У зв'язку з цим проведено дослідження рівня кальцитоніну та ПТГ за умов інтоксикації CdCl_2 (рис. 1).

На 14-у добу рівень кальцитоніну був нижчим у 12,5 разу, а ПТГ у 5,0 разу вищим за показники інтактних тварин. Такі результати з одного боку пояснюють зміни в концентрації Ca в плазмі крові експериментальних тварин, з іншого боку підтверджуються результатами досліджень стосовно цитотоксичної дії йонів Cd^{2+} на щитоподібну залозу [5].

Обмін Ca тісно пов'язаний з обміном Магнію (Mg) та Фосфору. Як видно із даних табл. 1, динаміка

змін концентрації Mg у плазмі крові мала протилежний характер до зміни вмісту Ca, що підтверджує тезу про те, що ці два макроелементи є фізіологічними антагоністами. Так, на 1-шу добу концентрація Mg була вищою у 2,3 рази відносно показників інтактних тварин, у наступні періоди різко знижувалася і становила 58–65 % від рівня показників контрольної групи ($p < 0,05$ – $0,001$). Метаболічна роль Mg у КТ визначається його участю як активатора багатьох ензимів, зокрема, ЛФ і пірофосфатази, що мають безпосереднє відношення до процесів мінералізації: в активному центрі кожної з двох ідентичних субодниць ЛФ знаходиться по два йони Zn^{2+} і одному йону

Mg^{2+} . Дослідження динаміки активності ЛФ в умовах надходження Cd^{2+} (табл. 2) показало, що активність ферменту була найнижчою на 1-шу добу після завершення введення $CdCl_2$ – у 2,1 разу ($p<0,001$), а потім поступово підвищувалась, у кінці спостереження залишаючись, однак, нижчою у 1,3 рази ($p<0,005$) за показники інтактних тварин. Протилежний характер змін спостерігався в динаміці активності КФ, яка є маркером діяльності остеокластів, а отже кісткової

резорбції: її активність достовірно перевищувала значення інтактних у 1,7–2,5 разів протягом всього періоду спостереження. Найвище значення активності КФ відзначено на 14-ту добу. Збалансованість процесів резорбції і остеосинтезу лежать в основі ремоделювання КТ і нормального перебігу всіх метаболічних процесів у ній, а відображенням гармонії цих процесів можна вважати відношення активностей ферментів – індекс ЛФ/КФ (табл. 2).

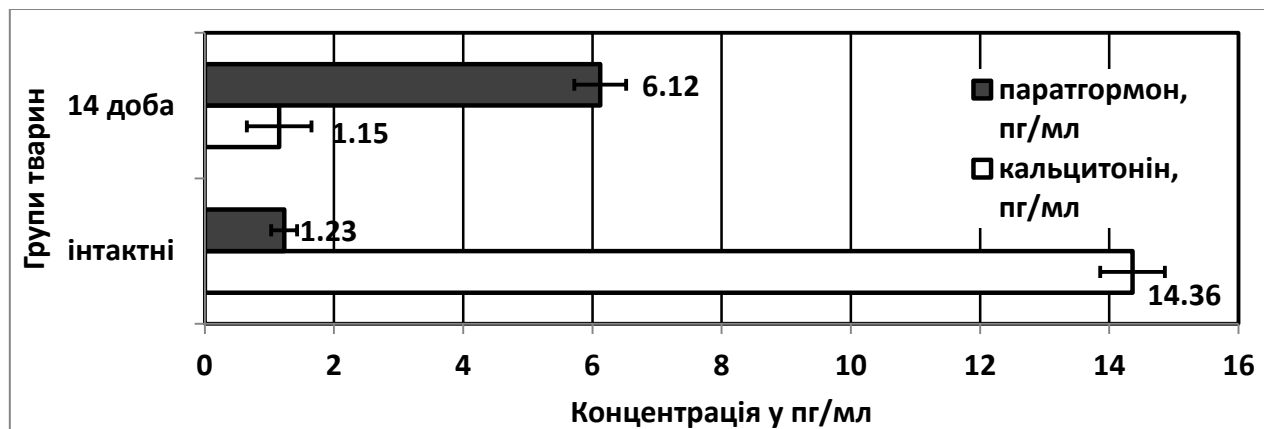


Рис. 1. Концентрація кальцитоніну та ПТГ у крові тварин дослідних груп на 14-у добу після введення $CdCl_2$, пг/мл

Таблиця 2

Активність лужної та кислої фосфатаз у плазмі крові щурів, (М \pm м)

Досліджувані показники (активність, мкмоль/с·л)	Групи тварин			
	контрольна (ін- тактні) n=18	Уражені $CdCl_2$		
		1-ша доба (n=13)	14-та доба (n=11)	28-ма доба (n=11)
ЛФ	15,07 \pm 0,08	7,23 \pm 0,65 ***	7,72 \pm 0,56 *	11,55 \pm 0,85 *
КФ	0,93 \pm 0,23	1,57 \pm 0,06 *	2,33 \pm 0,09***	2,02 \pm 0,07 *
Індекс ЛФ/КФ	16,20 \pm 0,31	4,61 \pm 0,09 **	3,31 \pm 0,16**	5,72 \pm 0,08 *

За результатами наших досліджень встановлено, що індекс ЛФ/КФ протягом всього періоду спостереження був достовірно нижчим у 2,8–4,9 разів за показники інтактних тварин, а найнижчі значення спостерігались на 14-ту добу, що свідчить про переважання процесів резорбції над остеосинтезом в цей період. За таких обставин дослідження концентрації неорганічних фосфатів у плазмі крові піддослідних тварин показало наступні зміни: на 1-шу добу цей показник достовірно не відрізнявся від показників інтактних (див. табл. 1). Проте, на 14-ту та 28-му доби відзначено достовірне зростання концентрації фосфатів відповідно на 32 % та 28 % відносно рівня контрольної групи. На тлі таких змін за умов надходження йонів Cd^{2+} , встановлено порушення обміну колагену – органічної матриці кістки, що підтверджується поступовим зростанням концентрації в плазмі крові гідроксипроліну (ГП) – маркерної амінокислоти катаболізму колагену. Зокрема, уже на 1-шу добу по завершенні введення $CdCl_2$ концентрація ГП в плазмі крові піддослідних тварин перевищувала значення інтактних у 1,9 разу; на 14-ту добу – у 2,1 разу, а на 28-му – у 2,5 разів.

Проведений нами кореляційний аналіз між досліджуваними показниками плазми крові щурів виявив достовірні кореляційні зв'язки ($p<0,05$). Зокрема, прямі зв'язки середньої сили встановлено між активністю ЛФ і концентрацією загального Са та фосфатів ($r=0,44$ та $0,34$ відповідно); активністю КФ і концентрацією загального Са, фосфатів та ГП (відповідно $r=0,47$, $0,55$ та $0,56$). Слід відзначити зворотні зв'язки між вмістом Mg^{2+} і активністю КФ, концентрацією ГП та неорганічних фосфатів у плазмі крові (відповідно $r=-0,66$, $-0,58$, $-0,44$); між фосфатами та активністю КФ – $r=-0,58$.

Результати визначення вмісту основних біоелементів у стегнових кістках наведено у табл. 3. Динаміки вмісту Са у золі стегнових кісток уражених Cd^{2+} щурів мала чітку тенденцію до зниження: на 13 % на 1-шу добу і 20 % на 28-му добу. Найнижчий вміст Са у стегнових кістках щурів був зафіксований на 14-ту добу – на 24 % нижче значень контролю. Одночасно, вміст Mg у стегнових кістках змінювався іншим чином: зростав незначною мірою у ранньому періоді на 4 %, а на 28-му добу знижувався на 25 % ($p<0,001$). Дослідження важливих остеотропних мік-

роелементів Zn і Cu дозволили встановити зниження вмісту Zn на 32 %, Cu – на 21 % уже на 1-шу добу порівняно з показниками інтактних тварин. У наступні періоди (14- та 28-а доби) вміст Zn дещо підвищувався, залишаючись, однак нижчим за показники інтактних на 22 – 23 % ($p<0,001$), а Cu продовжував знижуватися – до 32 % ($p<0,005$) показників інтактних тварин. Отже, дослідження вмісту макро- та мікроелементів у стегнових кістках щурів вказують на зменшення ступеня їх мінералізації за умов надхо-

дження в організм йонів Cd^{2+} . Поряд з цим, уміст у стегнових кістках Cd поступово зростає і на 1-шу добу після десятиденного надходження $CdCl_2$ перевищував показники інтактних у 4,6 разу, а на 28-му добу – у 9,8 рази.

Проведене дослідження МЩКТ щурів показало, що даний показник вірогідно знижувався протягом періоду спостереження (табл. 4): на 14-ту добу цей показник був нижчим на 51 % у епіфізах та на 52 % у діафізах стегнових кісток ($p<0,001$).

Таблиця 3

Вміст макро- та мікроелементів у стегнових кістках щурів, (M±m)

Досліджувані показники	Групи тварин			
	інтактні n=18	Уражені $CdCl_2$		
		1-ша доба (n=13)	14-та доба (n=11)	28-ма доба (n=11)
Кальцій, мг/г золи	330,9±6,2	289,0±3,9*	250,4±6,5 * #	264,1 ±7,7 **
Магній, мг/г золи	38,1±1,4	39,4±1,3	39,5±2,4	28,5±0,9 *
Цинк, мкг/г золи	458,6 ±37,2	310,5±23,6 **	356,6 ±10,0 **	355,4±8,1 **
Купрум, мкг/г золи	17,9±0,9	14,2±1,0 *	12,3±0,7 *	12,4±0,98 *
Кадмій, мкг/г золи	2,10±0,26	9,58±0,29 **	19,84±1,32 ***	20,61±1,06 ***

Таблиця 4

Мінеральна щільність стегнових кісток щурів, (M±m)

Ділянка стегнової кістки	Групи тварин		
	Інтактні (n=12)	Уражені $CdCl_2$	
		14-та доба (n=7)	28-ма доба (n=7)
Діафіз (кортикальна кістка)	34,19±1,28	16,37±0,98 ***	22,00±1,42**
Епіфіз (трабекулярна кістка)	35,90±1,21	17,66±1,33 ***	23,27±1,17**
Головка	34,49±1,53	14,39±0,95 ***	21,40±1,21***
Шийка	34,74±1,40	17,37±1,40 ***	20,45±0,91 ***

На 28-му добу МЩКТ дещо підвищувалась, залишаючись, однак, нижчою за показники інтактних тварин відповідно на 35 % та 36 % ($p<0,001$) у кінці експерименту. Аналогічно, МЩКТ у голові та шийці стегнових кісток щурів мала найнижчі значення на 14-ту добу: у голові на 58 %, а шийці – на 50 % нижче відносно показників інтактних. На 28-му добу цей показник дещо зростає, однак залишався нижчим за показники інтактних тварин на 38 – 41 %.

Отримані результати мають перспективу подальших досліджень у напрямку пошуку ефективних засобів корекції негативного впливу токсичного важкого металу кадмію на стан кісткової тканини як тварин, так і людей.

6. Висновки

1. Результати досліджень свідчать, що під впливом надходження йонів кадмію в організм тварин у плазмі крові спостерігаються достовірні зміни маркерів кісткового метаболізму, які вказують на порушення фосфорно-кальцієвого обміну (зміни концентрації іонізованого та загального кальцію, фосфатів, магнію, активності ферментів лужної та кислої фосфатаз), що має важливе значення для стану мінерального матриксу кісткової тканини. Одночасно відбу-

вається порушення стану органічної матриці кістки, зокрема колагену (зростає рівень гідроксипроліну). При цьому спостерігаються достовірні зміни зі сторони гормонів-регуляторів фосфорно-кальцієвого обміну: збільшується секреція паратгормону та знижується кальцитоніну.

2. Отримані результати вказують на те, що в процесі кадмієвої інтоксикації спостерігається зниження вмісту остеотропних біоелементів – Кальцію, Магнію, Цинку та Купруму у золі стегнових кісток на тлі істотного накопичення важкого металу Кадмію у тварин дослідної групи. Такі зміни макро- та мікроелементного складу супроводжуються зниженням МЩКТ, яке найбільш виражене на 14-ту добу експерименту.

3. Кореляційний аналіз виявив достовірні кореляційні зв'язки, зокрема, прямі зв'язки середньої сили встановлено між активністю лужної фосфатази і концентрацією загального кальцію та фосфатів; активністю кислої фосфатази і концентрацією іонізованого кальцію, фосфатів та гідроксипроліну. Слід відзначити виявлені достовірні зворотні зв'язки між умістом магнію і активністю кислої фосфатази, концентрацією гідроксипроліну та неорганічних фосфатів у плазмі крові.

Література

1. Обзор проблемы загрязнения кадмием, свинцом и ртутью окружающей среды в России и в Украине // Intergovernmental Forum on Chemical Safety Global Partnerships for Chemical Safety Contributing to the 2020 Goal., 2008. 60 р.
2. Параняк Р. П., Васильцева Л. П., Макух Х. І. Шляхи надходження важких металів в довкілля та їх вплив на живі організми // Біологія тварин. 2007. Т. 9, № 3. С. 83–89.
3. Moulis J.-M. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals // BioMetals. 2010. Vol. 23, Issue 5. P. 877–896. doi: <http://doi.org/10.1007/s10534-010-9336-y>
4. Thévenod F., Lee W.-K. Toxicology of Cadmium and Its Damage to Mammalian Organs // Metal Ions in Life Sciences. 2013. Vol. 11. P. 415–490. doi: http://doi.org/10.1007/978-94-007-5179-8_14
5. Кадмій в організмі людини і тварин. Надходження до клітин і акумуляція / Антоняк Г. Л. та ін. // Біологічна Студія. 2010. Т. 4, № 2. С. 127–140. doi: <http://doi.org/10.30970/sbi.0402.088>
6. Ersteniuk A. M., Khopta N. S., Bazalytska I. S. Correction of bone tissue alteration by artichoke extract in conditions of itai-itai disease // Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry. Lviv-Lublin, 2013. P. 38.
7. Valko M., Morris H., Cronin M. Metals, Toxicity and Oxidative Stress // Current Medicinal Chemistry. 2005. Vol. 12, Issue 10. P. 1161–1208. doi: <http://doi.org/10.2174/0929867053764635>
8. Bernard A. Cadmium and its adverse effects on human health // Indian Journal of Medical Research. 2008. Vol. 128, Issue 4. P. 557–564.
9. Васько Л. В., Кіптенко Л. І., Гортинська О. М. Ультраструктура кісткових клітин в умовах опромінення та вживання солей важких металів // Світ медицини та біології. 2011. № 4. С. 23–26.
10. Витяг з закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» // Морфологія. 2010. Т. IV, № 2. С. 73–75.
11. Атомно-абсорбційні методи визначення макро- та мікроелементів у біологічних середовищах при порушенні їх обміну в організмі людини: метод. рек. / Андрусишина І. М. та ін. Київ: ВД «Авіцена», 2010. 60 с.

Дата надходження рукопису 25.08.2018

Хопта Надія Степанівна, кандидат біологічних наук, доцент, кафедра біологічної та медичної хімії ім. ак. Г. О. Бабенка, Івано-Франківський національний медичний університет, вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, Україна, 76018
E-mail: khopta31@ukr.net

Ерстенюк Ганна Михайлівна, доктор біологічних наук, професор, кафедра біологічної та медичної хімії ім. ак. Г. О. Бабенка, Івано-Франківський національний медичний університет, вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, Україна, 76018
E-mail: erst@ukr.net